

Alteración de las aminotransferasas séricas y del cociente AST/ALT en el envenenamiento experimental por veneno de *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* en ratones NMRI

Alteration of serum aminotransferases and AST/ALT ratio in NMRI mice poisoning experimental with venom from *Crotalus vegrandis* and *Crotalus durissus cumanensis*

Noriega-Alvarado J.¹, Bravo A., Mogollón-Saldivia A., Navarrete L., Álvarez C., Pérez-Urrieta M.
¹Área de Bioquímica del Decanato de Ciencias Veterinarias de La Universidad "Lisandro Alvarado"
Telf 02512592423 Fax 0251259244. E-mail: jnoriega@ucla.edu.ve

RESUMEN

El hígado es susceptible a la toxicidad del veneno de cascabel, su funcionamiento puede ser monitoreado mediante las transaminasas. Se determinaron los niveles séricos de transaminasas y su cociente, en el envenenamiento experimental con veneno de *Crotalus vegrandis* (CV) y de *Crotalus durissus cumanensis* (CDC). Sesenta ratones divididos en 3 grupos, 2 experimentales inoculados con pool de veneno de CV o CDC a una dosis de 0,75 mg/kg vía intraperitoneal y ssf para el control. Se determinaron las enzimas a las 3, 6, 12 y 24 horas post-inyección. Los grupos inoculados con veneno de CDC mostraron aumento altamente significativo ($P < 0.01$) en los niveles séricos de ALT a las 12 y 24 horas con respecto al control, mientras que, con veneno de CV el aumento fue más elevado y se inician a las 6 horas. Para la AST el aumento fue progresivo y significativo desde las 6 horas para el grupo con veneno de CDC, mientras que con CV los niveles son más elevados y de inicio más temprano. La relación AST/ALT aumenta significativamente a partir de la 3 horas para el grupo CV y altamente significativo ($P < 0.01$) a las 6, 12 y 24 horas, mientras que con CDV el aumento en la relación AST/ALT es altamente significativo a las 6 horas. Los resultados sugirieron que el veneno de CV produce mayor daño al tejido hepático que el de CDC. El índice AST/ALT podría emplearse como un indicador de la severidad del daño hepático y su evolución en la toxicidad por *Crotalus*.

Palabras clave: Veneno de *Crotalus*, Hígado, Transaminasas.

ABSTRACT

The liver is susceptible to crotalus venom toxicity, its function may be monitored using transaminases. Transaminases level and their ratio were determined in serum of experimental mice poisoning with *Crotalus vegrandis* venom (CV) and *Crotalus durissus cumanensis* (CDC). 60 mice divided into three groups, two experimental inoculated with venom pool CDC or CV were at a dose of 0.75 mg/kg intraperitoneally and control ssf. Enzymes were determined at 3, 6, 12 and 24 hours post-injection. The groups inoculated with venom CDC showed highly significant increase ($P < 0.01$) in serum ALT levels at 12 and 24 hours compared to control, whereas with increasing venom CV higher and started at 6 hours. The progressive and significant increase of AST was from 6 hours to the CDC group venom, whereas CV were higher and with earlier onset. The CV group AST/ALT ratio was significantly increased from 3 hours to the group CV and highly significant ($P < 0.01$) at 6, 12 and 24 hours, whereas the increased CDV AST / ALT ratio is highly significant to the 6 hours. The results suggest that the CV venom produces greater damage to liver tissue than the CDC. The index AST/ALT could be used as an indicator of the severity of liver damage and its evolution in *Crotalus* toxicity.

Key words: *Crotalus* venom, liver, transaminases.

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es la lesión que resulta de la mordedura o inoculación accidental de sustancias por una serpiente venenosa sea que deje o no consecuencias para la salud. Estos animales poseen glándulas capaces de segregar venina que son depositadas a través de un aparato inoculador en el hombre y en los animales [1]. Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud pública relevante en la región latinoamericana, afectan fundamentalmente a la población rural involucrada en trabajos agrícolas [2];[3]. La fisiopatología del accidente ofídico es compleja, el cuadro clínico se caracteriza por daños locales rápidos y prominentes (edema, dolor, sangrado, necrosis), seguidos de alteraciones sistémicas (sangrado, cuagulopatías, choque cardiovascular, insuficiencias renal aguda) [2];[4]. Estudios sobre las alteraciones locales y sistémicas inducidas por el veneno de algunas especies de *Crotalus* han mostrado alteraciones hemorrágicas en varios órganos [5];[6], shock cardiovascular [5] y desórdenes en la coagulación [7].

Los venenos de las serpientes son de naturaleza proteica, estos constituyen entre el 90-95% de su peso y son las responsables de casi la totalidad de sus efectos [8]. Las especies y subespecies de *Crotalus* existentes en Venezuela son: *Crotalus vegrandis* (Klauber, [9]; *Crotalus durissus ruruima* [10]; *Crotalus durissus cumanensis* [11]; *Crotalus pifanorum* [12] y *Crotalus mariscelae* [13]. La variabilidad en la composición de los venenos de serpiente y sus efectos, no es únicamente entre especies de la misma familia, sino también se deben a cambios en su ubicación geográfica, la dieta, las condiciones de cautiverio, la técnica para la extracción, así como las vías de inoculación del veneno [14];[15].

En el organismo el hígado cumple un papel fundamental en el metabolismo de las grasas, carbohidratos y proteínas. Igualmente es el sitio de desintoxicación de los productos de desecho del metabolismo, lleva a cabo la síntesis de bilis, proteínas plasmáticas y ayuda a mantener los niveles de glucosa en sangre [16]. Existen ciertos marcadores bioquímicos que permiten conocer la función hepática, son parámetros que determinan la normalidad o la alteración del hígado dentro de una gama de diferentes patologías [16]. Los marcadores más utilizados para evaluar las lesiones hepáticas han sido las transaminasas: aspartato amino transferasa (AST) y alanina amino transferasa (ALT), la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), la fosfatasa alcalina (FA), la 5' Nucleotidasa, la deshidrogenasa láctica (LDH), la bilirrubina total y fraccionada, las proteínas totales y los factores de coagulación, de todos, la (AST) y la

(ALT) son las más usadas [17]. La relación AST/ALT es utilizada como un método no-invasivo, que provee información útil en relación a la causa y la severidad de la enfermedad hepática [17].

Ha sido determinado que la exposición al veneno de *Crotalus durissus cumanensis* producen aumentos en los niveles séricos de (ALT) y (AST), lo cual es indicativo de daño hepático [18]. Asimismo, el envenenamiento en ratas con el veneno de *Crotalus durissus terrificus* incrementa los niveles séricos de ALT y AST en las primeras 24 horas, luego de la inoculación del veneno [19]. Al emplear veneno de *Bothrops*, los niveles séricos de la ALT alcanzan un máximo a las 9 h, mientras que la AST aumenta entre 3-9 h [20];[21]

El objeto de este estudio fue comparar los niveles séricos de ALT y AST, y establecer la relación AST/ALT en el envenenamiento experimental por *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* en ratones NMRI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó veneno recolectado de *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* adultas mantenidas en cautiverio en el Laboratorio de Toxicología del Decanato Ciencias Veterinarias de la Universidad centroccidental "Lisandro Alvarado". Las serpientes permanecen individualmente en un terrarium de vidrio de 40 x 40 x 30 cm con tapa de madera y una malla metálica, en el ambiente se mantiene una temperatura diurna de 30°C y nocturna de 24°C.

La obtención del veneno de 10 ejemplares adultos de *Crotalus vegrandis* y 10 de *Crotalus durissus cumanensis* se realizó mediante ordeño manual sosteniendo al animal y haciéndolo inocular su veneno sobre una cápsula de petri como lo describe la técnica de Sadner [22], se obtuvo un pool de veneno al mezclar 100 µL de cada uno, para posteriormente preparar una solución de veneno de cada subespecie, a una concentración necesaria para inyectar dosis de 0,75 mg de proteínas de veneno/Kg de ratón.

Se utilizaron 60 ratones cepa NMRI divididos en 3 grupos: 2 grupos (experimentales) fueron inoculados con la solución de veneno de *Crotalus vegrandis* o de *Crotalus durissus cumanensis* de acuerdo a su peso, más la cantidad suficiente de solución fisiológica (0,9%) para un total de 50 µL de la suspensión que fue inyectada vía intraperitoneal. Un grupo control que fue inoculado con 50 µL de solución fisiológica al 0,9 % vía intraperitoneal. Los 3 grupos fueron divididos en 4 subgrupos y se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea media a intervalos de 3, 6, 12 y 24 h post-inyección del veneno. Para la determinación de

las enzimas se obtuvo suero sanguíneo por centrifugación de la sangre obtenida a 800 g durante 10 min, que fue almacenado a 4 °C para su posterior análisis.

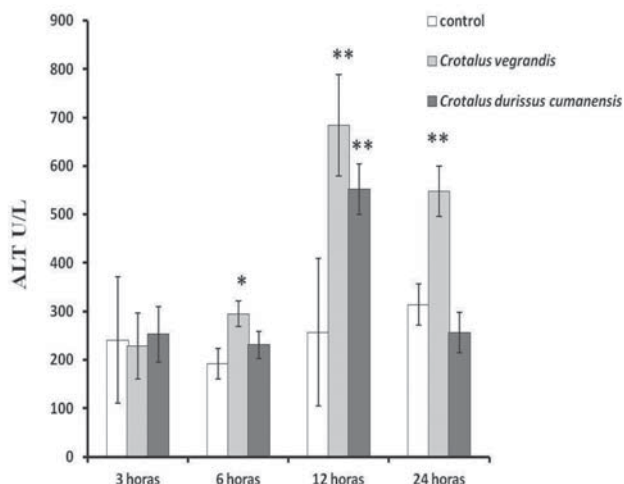
A las muestras de suero de cada grupo se les determinó la actividad de las enzimas: alanina amino transferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) mediante kit comercial (invelab®), las muestras fueron determinadas mediante el uso del equipo fotocolorímetro Star Fax (Omega IV), se determinó la relación (AST/ALT).

Los resultados de la determinación enzimática se analizaron con Anova para detectar variaciones significativas por efecto del veneno en los distintos tiempos post-inoculación y se realizó una comparación de medias con el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows, se tomó como nivel de significancia un intervalo de confianza de 95% ($P < 0,05$) [23].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 representa las medias de los niveles séricos de la enzima ALT en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus vegrandis* (CV) y *Crotalus durissus cumanensis* (CDC), se observa un aumento en los niveles séricos de ALT en ambos grupos inoculados a partir de las 6 horas, sin embargo, para el grupo CV el aumento fue progresivo y significativo ($P < 0,05$) a las 6 horas post-inyección y altamente significativo ($P < 0,01$) entre las 12 y las 24 horas alcanzando niveles de 684 U/L a las 12 horas. Mientras

Figura 1. Niveles séricos de la enzima ALT (TGP) en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* a diferentes intervalos post-inyección. Las barras representan la media \pm la desviación estándar, $n=5$ * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$



que, el grupo CDC no experimenta cambios significativos durante las 6 primeras horas post-inoculación para luego alcanzar un valor altamente significativo ($P < 0,01$) a las 12 horas, con un máximo de 552 U/L a las 12 horas, para disminuir a los niveles del control a las 24 horas.

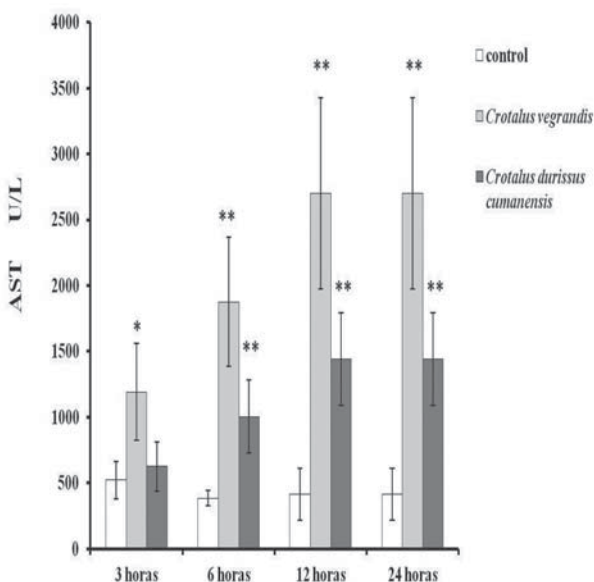
La ALT es una enzima que se considera específica para determinar daño hepático [24]. Resultados similares a los encontrados en el grupo CV fueron obtenidos en otra especie del mismo género (*Crotalus durissus terrificus*) donde se observa un pico máximo a las 24 horas [19]. Noriega et al [18] describió que la exposición de veneno de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/c produce aumento en los niveles séricos de ALT a partir de la primera hora de exposición alcanzando un valor máximo a las 24 horas.

Para otras especies como *Bothrops asper* y *Bothrops alternatus*, donde se emplearon dosis superiores a la empleada en este estudio, la ALT tiene un pico máximo a las 9 horas pero con valores en los niveles séricos de ALT menores a los encontrados en nuestros resultados [20];[21], esto pudiera indicar que el veneno de *Crotalus* es más tóxico en el tejido hepático que el de otras especies en particular el veneno de CV.

La figura 2 muestra las medias de los niveles séricos de la enzima AST en ratones NMRI inoculados con veneno de CV y CDC, se observa un incremento significativo ($P < 0,05$) de AST a partir de la tercera hora para el grupo CV y altamente significativo ($P < 0,01$) a las 6, 12 y 24 horas, alcanzando un máximo valor de 2.701 U/L a las 24 horas post-inyección. Para el grupo CDC el aumento en los niveles de AST es altamente significativo a partir de las 6 horas hasta las 24 horas con un máximo de 1.441 U/L, aunque menor que el encontrado en el grupo de CD. Las enzimas AST están presente como isoenzimas citosólicas y mitocondriales en numerosos tejidos [24], en este estudio la inoculación de veneno produjo una variación en la actividad de la enzima AST que junto con los niveles de ALT son indicativos de daño hepático; sin embargo, la AST puede aumentar también en respuesta a un daño muscular severo [25].

En trabajos realizados empleando el veneno de *Crotalus durissus terrificus* los niveles séricos de la enzima AST presentaron un pico máximo de esta enzima a las 24 horas [17], Noriega et al [18], encontraron niveles de AST altamente significativos entre las 3 y las 12 horas post-inyección en ratones Balb/c inoculados con veneno de CDV. Estos resultados pudieran reforzar la hipótesis de que el veneno de las especies en estudio es más tóxica y está afectando otros tejidos en los que se encuentra esta enzima; sin embargo, otros géneros de serpiente como *Bothrops* produce aumento en los niveles séricos de AST entre

Figura 2. Niveles séricos de la enzima AST (TGO) en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* a diferentes intervalos post-inyección. Las barras representan la media \pm la desviación estándar, n=5 *P<0.05; **P<0.01



las 3 y 9 horas pero con valores inferiores a los encontrados en este estudio [20];[21]

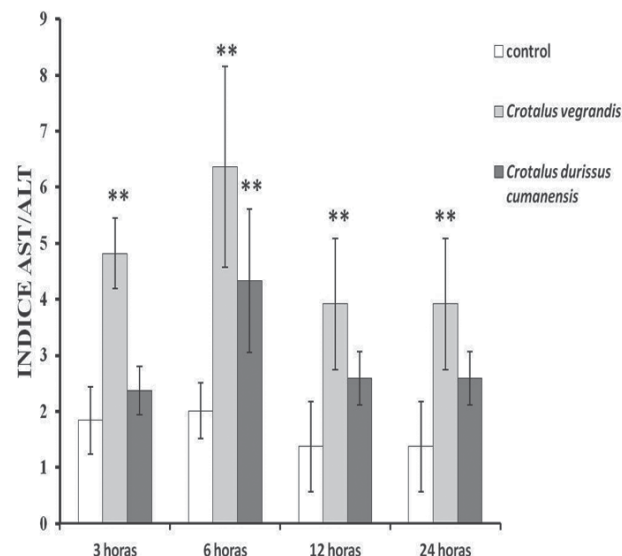
La figura 3 muestra el incremento altamente significativo (P<0.01) de la relación AST/ALT a las 3, 6, 12 y 24 horas, alcanzando un máximo valor de 6,36 a las 6 horas post-inyección. Para el grupo CDC el aumento en la relación AST/ALT es altamente significativo sólo a las 6 horas alcanzando un valor de 4,33, aunque para las 3, 12 y 24 horas la relación se incrementa, estos valores no fueron estadísticamente significativos.

Los aumentos en los niveles séricos de ALT o AST son indicativos de daño en el parénquima hepático, probablemente se deba a que el veneno de las serpientes de este género posee fosfolipasa A2 una enzima que actúa dañando la integridad de la membrana celular, liberando los componentes celulares al torrente sanguíneo [26]. Debido a que la AST está presente en distintos órganos, un aumento en los niveles séricos de esta enzima pueden sugerir además daño renal, daño al tejido muscular estriado, muscular esquelético o daño a tejido nervioso; se presume es esta la razón por la cual los niveles séricos de esta enzima fueron mayores durante la realización de los ensayos en comparación con los de ALT. Sin embargo, un aumento en los niveles séricos de ALT es más específico de daño hepático [16].

Si tomamos en cuenta la relación AST/ALT podríamos diagnosticar enfermedad hepática, ya que

este método es usado para conocer la evolución de la enfermedad; en casos de ictericia obstructiva y hepatitis, donde la relación AST/ALT menor o igual a 1. Mientras que si la relación es mayor a 1 se diagnostica enfermedad hepática por alcoholismo y hepatitis crónica [14]. Los valores elevados de la relación AST/ALT obtenidos en los grupos experimentales, sugieren que el veneno de estas especies produce un daño tóxico agudo al parénquima hepático similar al producido por el alcoholismo. Los valores de AST/ALT encontrados en el grupo CV indican que el daño se inicia a las 3 horas post inyección, sin embargo, a las 3 horas la relación AST/ALT aumenta a expensas de los niveles séricos de la AST, sin aumentos considerables en los niveles séricos de ALT, lo que podría sugerir que el daño inicial es en otros tejidos que contienen isoformas de AST, mientras que, el daño hepático comenzaría a las 6 y hasta las 24 horas, para el grupo CDC. La relación AST/ALT es elevada sólo a las 6 horas indicando que el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* produce daño hepático agudo máximo a las 6 horas, resultados similares a los encontrados por Pérez et al [27]. Los niveles séricos de ALT, AST y la relación AST/ALT encontrados en el grupo CV indican que el veneno de *Crotalus vegrandis* es más tóxico para el hígado y su efecto es más prolongado en el tiempo que el veneno *Crotalus durissus cumanensis*, sin embargo este aspecto debe ser estudiado con mayor profundidad, ampliando el número de las muestras y las horas de experimentación. Es importante señalar que en animales poco ha sido descrito sobre el comportamiento de la relación ALT/AST, en esta

Figura 3. Índice ALT/AST en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* a diferentes intervalos post-inyección. Las barras representan la media \pm la desviación estándar, n=5 *P<0.05; **P<0.01



investigación todos los promedios para la relación AST/ALT que se ubicaron por encima de la media del grupo control (2,07) fueron considerados mayores e indicativos de daño hepático agudo.

Finalmente, los parámetros hepáticos deben ser tomados en cuenta al momento de monitorear pacientes con accidente ofídico por cascabel, de esta manera se puede contribuir a una atención más adecuada, ya que el hígado es un órgano que contribuye a la desintoxicación, pero además es muy sensible y sus marcadores de funcionalidad son una herramienta que indican la severidad del daño y la evolución del paciente en la toxicidad por *Crotalus*.

CONCLUSIONES

La exposición al veneno de *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus cumanensis* produce aumento en los niveles séricos de la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) sugiriendo daño al tejido hepático, sin embargo, como la AST presenta formas isoméricas que están localizadas en otros tejidos, los niveles elevados de AST indican daño simultáneo en los tejidos donde está presente esta enzima.

La exposición al veneno de *Crotalus vegrandis* produce niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) más elevados que los encontrados en la exposición al veneno de *Crotalus durissus cumanensis* sugiriendo que el daño al tejido hepático es mayor en esta especie de *Crotalus*.

Los valores elevados de la relación AST/ALT obtenidos en los grupos experimentales, sugieren que el veneno de estas especies produce un daño tóxico agudo al parénquima hepático similar al producido por el alcoholismo y la cirrosis hepática.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Charry H. "Aspectos biomédicos del accidente bothropico". En: 1er Simposio de Toxinología Clínica "Cesar Gómez Villegas". Lab. Probiol. Ltda. Facultad de medicina Fundación Universitaria San Martín. Bogotá; p.1-24.

[2] Gutiérrez J, Romero M, Díaz C, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1995; 33: 19-29.

[3] Chippaux JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull. World Hlth. Org* 1998; 76: 115-524.

[4] Otero, R., Tobón, G.S., Gómez, L.F., Osorio, R.G., Balderrama, R., Hoyos, D., Uretra, E., Molina,

S., Arboleda, J.J. 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (Marzo 1989-Febrero del 1990). *Acta Méd Colombiana* 17:229-249.

[5] Carlsson RW, Schaeffer RC, Whigham H, Michaelis S, Russell FE, Weil, MH. Rattlesnake venom shock in the rat: development of a method. *Am J Physiol* 1975; 229: 1668-1674.

[6] Tu AT, Homma M. Toxicologic study of snake venoms from Costa Rica. *Toxicol appl Pharmac* 1980; 16:73-78.

[7] Owny CL. Pathology of rattlesnake envenomation. En: *Venoms, Their Actions and Treatment*, A.T. Tu Editor. New York; 1982. p. 163-209.

[8] Bon C. Venins de serpents et pharmacopées. En: *Les Serpents*, R. Bauchot editores. Paris Bordas, 1994 p. 194-209.

[9] Klauber, L. Four papers on the applications of statistical methods to the herpetological problems. *Bull Zool Soc* 1941; 17: 1-95.

[10] Hoge A. Preliminary account on neotropical Crotaline (Serpentes: Viperidae). *Mem Inst Butatan* 1965; 32: 109-184.

[11] Humboldt A. Sur deux nouvelles especies de crotales. *Rec. D'Obs. Zool Anat Comp* 1811: II 1-8.

[12] Sadner M. Of Ponz de Venez "Bothrops venezuelae, sp. nov". *Novedades científicas* 1961; 30.

[13] García-Pérez J. Una nueva especie de cascabel (Serpentes: Crotalidae) para el bolsón árido de Lagunillas, Cordillera de Mérida, Venezuela. *Revista Ecológica Lat Am* 1995; 3: (1-3) 07-12.

[14] Francischetti I, Gombarovits M, Valenzuela J, Carlini C, Guimaraes J. Intraspecific variation in the venoms of the South America rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part c* 2000; 127: 23-36.

[15] Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López J, Chávez E, et al Geographic and ontogenetic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop* 2002; 50 (1): 337-346.

[16] Giannini E, Testa R, Savarino, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Review Synthese. Canada's Leading Medical Journal* 2005; 3: 172.

[17] Kaplan L, Pesce A. *Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation*. Second edition. The Mosby Company. St. Louis. USA 1989. p. 368-370.

[18] Noriega-Alvarado J, Colmenarez D, Mogollón A, Márquez N, Hernández V, Pérez M. Cambios séricos en las enzimas Alt, Ast, Fa, Ck-total y Ldh inducidos por veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/C. *Revista Científica, FCV-LUZ* 2009. XIX: 4, 408

- 413.

[19] Acosta de Pérez O, Koscinczuk P, Teibler P, Ruiz R, Sánchez NM, Maruñak S, Mussart de Coppo, N. Intoxicación por veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) en ratas. *Acta toxicol. Argent* 1997; 5 (2):71-4.

[20] Gutiérrez JM, Arroyos O, Bolaños R. Mionecrosis, Hemorragia y Edema Inducidos por el Veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 1980; 18: 603- 610.

[21] Teibler P, Acosta de Pérez O, Maruñak S, Ruiz R, Koscinczuk P, Sánchez N, Mussart de Coppo N. Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. *Acta toxicol Argent* 1999; 7(1):7-10.

[22] Sadner M. Of. Ponz. De Venez. "*Bothrops venezuelae*, sp. Nov. "Novedades Científicas" 1961; N 30.

[23] Contreras F. Estadística descriptiva y análisis descriptivo con SPSS. Aplicaciones de la Curva Normal. Fondo Editorial UNET 2007. Capítulo IX. San Cristobal Venezuela. p. 271-321.

[24] Sherlock S. Drugs and Liver. In: Sherlock, S. Diseases of the Liver and Biliary System. 7th Ed. Blackwell, London. 1985. p. 304-333.

[25] Nishimura H, Yasaki Y. Biochemical tests for diagnosis of acute myocardial infarction and estimation of infarct size. *Nippon Rincho* 1994; 52: 755-759.

[26] Soares A, Mancin A, Cecchini A, Arantes E, França E, Gutiérrez, J., Giglio J. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int. J. Biochem. Cell. Biol* 2001; 33: 9 877-889.

[27] Pérez-Urrieta M, Noriega-Alvarado J, Mogollón Saldivia A, Colmenarez D, Marín Barico R, Alarez C. Niveles séricos de ALT, AST y su índice en ratones (NMRI) inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de perfiles electroforéticos distintos. *GCV*; 2010. 15(1): 11-15.